

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. ІГОРЯ
СІКОРСЬКОГО»**

ПРИЛУЦЬКИЙ МАКСИМ ПЕТРОВИЧ



УДК:547.415.5:[616 006.6:612.6]

**РОЗРОБКА БІОСЕНСОРНИХ ПЛАТФОРМ ТА БАЗОВИХ АЛГОРИТМІВ
АНАЛІЗУ ДЛЯ ЕКСПРЕСНОЇ ДІАГНОСТИКИ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ
ЛЮДИНИ В УМОВАХ *IN VITRO***

03.00.20 «Біотехнологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі лабораторної діагностики біологічних систем, Національного університету «Києво-Могилянська академія»

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Стародуб Микола Федорович, Національний університет біоресурсів і природокористування МОН України, завідувач кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
Колибо Денис Володимирович, Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, головний науковий співробітник відділу молекулярної імунології


кандидат біологічних наук, доцент,
Скроцька Оксана Ігорівна, Національний університет харчових технологій МОН України, доцент кафедри біотехнології і мікробіології

Захист дисертації відбудеться «20» листопада 2020 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258).

З дисертацією можна ознайомитися у Науково-технічній бібліотеці ім. Г. І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37)

Автореферат розісланий « » 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
Д 26.002.28, д.т.н., доц.



Н. Б. Голуб

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Актуальним завданням сучасної біотехнології є пошук нових ефективних методів аналізу внутрішньоклітинних агентів у малігнізованих клітинах. В якості таких агентів можуть використовуватися поліаміни, ендогенні аліфатичні полікатіони, які синтезуються в клітинах і широко залучені у процес малігнізації [Bachrach et al., 2001; Gerner, Meyskens, 2004, Щербіна О. В., 2008]. Зокрема, поліаміни здатні зв'язуватися з ДНК і брати участь у формуванні ДНК-білкових взаємодій під час поділу клітини (Thomas T., Thomas T. J., 2001). Вивченню поліамінів, як діагностичних маркерів злоякісного росту, присвячено багато праць (Russell et al., 1971; Russell, 1984; Залеток С.П., 1977; Bergeron et al., 1997; Yamaguchi et al., 2005; Kawakita, Hiramatsu, 2006). Однак, залишилися деякі питання, щодо використання поліамінів при аналізі перебігу злоякісного процесу за допомогою біосенсорів. Зокрема невирішеною залишається проблема своєчасного виявлення процесів малігнізації, яка полягає у відсутності надійних методик для раннього виявлення неопластичного процесу (Михайлович Ю.Й 2012; Федоренко З. П., 2015). Сучасні методи детекції біомаркерів раку грудної залози, такі як імуноферментний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція трудомісткі та високозатратні (Білинський Б. Т., 2010, Soda K., 2011, Pegg E., 2017). Тоді, як біосенсиори можуть визначати специфічні молекули в дуже низьких концентраціях за рахунок антитіл до маркерів, характерних для певних видів раку. (Monteiro et al., 2015). Біосенсиори дозволяють виявляти низькомолекулярні сполуки і використовуються у сучасній діагностичній практиці онкологічних захворювань (Сергеева Т. А., Єльська Г. В., 2016). Одним з таких захворювань є рак грудної залози, який на сьогодні складає 25% від інших видів раку в Україні (Бюлетень Національного канцер-реєстру №20 – Рак в Україні, 2017-2018). Клітинна лінія раку грудної залози відображає патологічні процеси, які обумовлені розвитком захворювання і є адекватною моделлю для досліджень в умовах *in vitro* (Vantangoli M. et al. 2015). Тому розробка методів експресної діагностики грудної залози людини в умовах *in vitro* є актуальною та доречною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є складовою державної теми кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія» «Розробка біосенсорних платформ та базових алгоритмів аналізу для експресної діагностики раку грудної залози людини в у культурі *in vitro*» (номер державної реєстрації 0116U004703, 2016–2018 рр.); науково-дослідної роботи кафедри лабораторної діагностики біологічних систем, Національного університету «Києво-Могилянська академія», яка була частиною проекту міжнародного науково-технічного співробітництва Україна-Латвія «Пошук базового ефективного алгоритму біосенсорного експрес-контролю біохімічних параметрів розвитку онкологічного ураження та ефективності його лікування» (номер державної реєстрації : 0117 U005082, 2017–2018 рр.).

Об'єкт дослідження: визначення кількісного та якісного складу поліамінів в клітинах раку грудної залози в умовах *in vitro*, а також в зразках крові хворих на рак грудної залози за допомогою імунобіосенсорного аналізу на основі явища поверхневого плазмонного резонансу.

Предмет дослідження: біогенні поліаміни, культура клітин раку грудної залози та сироватка крові хворих на рак грудної залози, постановка імуноаналізу за допомогою біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу для експрес-визначення біогенних поліамінів.

Мета. Створення та відпрацювання ефективної методики якісного та кількісного імунобіосенсорного аналізу поліамінів в культурі клітин *in vitro* та зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози з використанням біосенсору на основі явища поверхневого плазмонного резонансу.

Завдання

1. Визначити найбільш ефективний алгоритм аналізу при підготовці чутливої поверхні біосенсора
2. Визначити межі чутливості біосенсора з використанням модельних розчинів поліамінів та побудувати калібрувальні криві.
3. Провести аналіз поліамінів на лінії MCF-7 в культурі клітин *in vitro*
4. Порівняти ефективність визначення поліамінів в модельних розчинах та культурі клітин з використанням різних типів трансдюсерів
5. Провести якісний та кількісний аналіз поліамінів у сироватці крові пацієнтів хворих на рак грудної залози та порівняти отримані дані з контрольними зразками.

Методи дослідження. культуральні, цитологічні, мікроскопічні, біофізичні (сенсibiliзація поверхні трансдюсера, постановка імуноаналізу на основі поверхневого плазмонного резонансу), статистичні (математична обробка результатів дослідження).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено методику визначення біогенних поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу. Наукова новизна отриманих результатів захищена патентом на корисну модель №118303 «Спосіб визначення поліамінів для експресної діагностики раку грудної залози в умовах *in vitro*», який було зареєстровано 25.07.2017. Основна особливість розробленої методики полягає у використанні нових специфічних маркерів для діагностики - поліамінів, та модифікації біосенсора специфічними антитілами, які здатні виявляти поліаміни, що робить використання даної методики орієнтованим на діагностику раку грудної залози. Виявлено прямопропорційну залежність між зміною концентрації поліамінів у зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози та зміною резонансного кута біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу. Обернено пропорційну залежність виявлено при визначенні поліамінів за допомогою біосенсора на основі фотолюмінесценції наночастинок оксиду цинку. Визначено ефективність індикації поліамінів біосенсорами на основі явища поверхневого плазмонного резонансу та фотолюмінесценції на основі наночастинок оксиду цинку.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено методику визначення поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози з використанням біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу. Розроблена методика дозволяє у досить короткі терміни (до 15 хв)

визначати наноконцентрації поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози та повторно використовувати компоненти біосенсора при повторному аналізі. Скорочення часу дозволить здешевити методику, а визначення поліамінів у малих концентраціях допоможе покращити діагностику хвороби на ранніх стадіях. Окрім того, розроблений метод дозволяє досліджувати динаміку розвитку онкологічного захворювання за допомогою визначення концентрації поліамінів в режимі реального часу. На основі результатів дисертаційної роботи розроблено патент на корисну модель та зареєстровано технологію. Результати досліджень впроваджені у роботу клініко-діагностичної лабораторії «Альфа-лабсервіс» (м. Харків) та навчальний процес та наукову роботу на кафедрі лабораторної діагностики біологічних систем факультету природничих наук Національного університету «Києво-Могилянська академія» (м. Київ). Розроблена методика може використовуватися онкодіагностичними лабораторіями, науково-дослідними інститутами та лікарнями для діагностики пацієнтів на рак грудної залози.

Особистий внесок здобувача. Відповідно до мети та завдань досліджень здобувачем самостійно проведено аналіз джерел наукової літератури з напрямку досліджень вітчизняних та закордонних авторів; розроблено схему досліджень, безпосередньо проведено експериментальні дослідження щодо модифікації поверхні трансдюсера та оптимізації методики постановки імуноаналізу для визначення поліамінів на основі поверхневого плазмонного резонансу.

Спільно з науковим керівником сформульовано тему дисертаційної роботи, мету та завдання дослідження, сформульовано висновки. З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертації використано лише ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на 3-й міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» (Київ, 2015), Науково-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2015), 7-й Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, 2016), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Профілактика неінфекційних захворювань: фокус на коморбідність» (Харків, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції “International scientific conference on medicine” (Рига, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, з них 6 статей, 4 з яких у фахових наукових виданнях України включених до міжнародних наукометричних баз даних (1 з них індексується наукометричною базою Scopus), 1 стаття у фахових наукових виданнях України, 1 стаття у фахових іноземних виданнях, 5 тез науково-практичних конференцій, патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота включає анотації, вступ, огляд літератури, опис напрямів дослідження, матеріали і методи виконання роботи, розділи результатів експериментальних досліджень, їх узагальнення та аналіз, список використаних джерел та додатки. Матеріал викладено на 132 сторінках друкованого тексту. Робота містить 27 рисунків і 4 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В цьому розділі розглянуто анатомічну структуру грудної залози, фізіологічні та біохімічні процеси, які виникають при розвитку раку грудної залози. Також, було розглянуто сучасні методи діагностики раку грудної залози, серед яких особливу увагу було приділено використанню різноманітних біосенсорів, зокрема оптичних.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Матеріали та методи. Робота з розробки біосенсора та модифікації трансдюсерної чутливої поверхні в основному базується на роботах Стародуба М. Ф (Starodub N. F., 2005, 2010, 2013), у яких автор описує процес модифікації трансдюсерної поверхні для певних біологічних агентів, які в основному являють собою сполуки бактеріального чи вірусного походження. Використання ж поліамінів у якості онкомаркерів для діагностики раку грудної залози описані у багатьох роботах [Zaletok S. P., 2004; Soda K., 2011; Casero A., 2018], тому методику згаданих вище авторів було вирішено адаптувати для розробки нового біосенсору для діагностики раку грудної залози. Основні дослідження виконували на біосенсорному пристрої «Плазмонтест», люб'язно наданого інститутом кібернетики ім. В. М. Глушкова.

Модифікація поверхні трансдюсера для біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР). У якості трансдюсера для біосенсора на основі ППР використовували скляну пластинку з напиленням шаром золота товщиною 50 нм розміщали на спеціальній призмі у вимірювальній комірці. Дана пластинка надалі слугувала трансдюсером – перетворювачем біологічної взаємодії в електричний сигнал. Для створення аналітичної системи використовували 0,1М фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS), який вносили в комірку в об'ємі 1 мл. Далі на поверхню трансдюсера наносили розчин білка А від *Staphylococcus aureus* (Sigma) (1 мкг/мл), і витримували його протягом 20 хв. Після ретельного промивання поверхні за допомогою PBS і реєстрації величини резонансного кута, в комірку вносили розчин моноклональних антитіл (Sigma) у концентрації 100 мкг/мл в об'ємі 20 мкл до сперміну чи до спермідину людини. Далі на поверхню трансдюсера наносили розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА) в об'ємі 20 мкл в концентрації 1 мкг/мл. Через 30 хв поверхню трансдюсера промивали за допомогою PBS. та реєстрували величину резонансного кута.

Визначення ефективного алгоритму аналізу. Визначали ефективність алгоритмів аналізу поліамінів з використанням біосенсорного пристрою «Плазмонтест». Для визначення поліамінів за допомогою аналітичного приладу імуносенсора, на трансдюсерній поверхні іммобілізували специфічні антитіла, що взаємодіяли з клітинними антигенами, завдяки чому реєстрували зсув

величини резонансного кута. В якості модифікуючих речовин використовували поліаліамінгідрохлорид (ПАГ) у концентрації 1 мкг/мл. ПАГ за структурою і властивостями є поліелектролітом, який дозволяв підвищити чутливість біосенсора за рахунок утворення на поверхні трансдюсера плівки з негативно та позитивно заряджених іонів. Білок А отриманий від бактерії *Staphylococcus aureus* дозволяв зорієнтувати антитіла, які використовувались при формуванні чутливого шару біосенсора у розчин специфічними F(ab)-фрагментами, зв'язується з Fc-фрагментом антитіл. Дана модифікація дозволяла підвищити ефективність аналізу біосенсора шляхом вивільнення чутливих ділянок антитіл і запобігала хаотичній сорбції антитіл на поверхні трансдюсера. Окрім білка А, було використано бичачий сироватковий альбумін (БСА) у концентрації 1 мкг/мл, який дозволяв заблокувати неспецифічні місця зв'язування на поверхні трансдюсера і таким чином також підвищити ефективність аналізу.

Для створення нової методики визначення поліамінів за допомогою імунобіосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР) і конструювання чутливої до них поверхні перетворювача, перевірили ефективність декількох алгоритмів визначення поліамінів – «прямого», «конкурентного» та «до насичення». Використовуючи «прямий» алгоритм, іммобілізували специфічні антитіла, які безпосередньо взаємодіяли з поліамінами на поверхні трансдюсера. Другий алгоритм – «до насичення», за допомогою якого попередньо іммобілізовані специфічні антитіла кон'югували з вільними поліамінами, а потім поліамінами, кон'югованими з БСА. Третій алгоритм аналізу – конкурентний, коли поліаміни кон'югували з БСА (за допомогою глутаральдегіду), іммобілізованого на поверхні трансдюсера (рис.1).

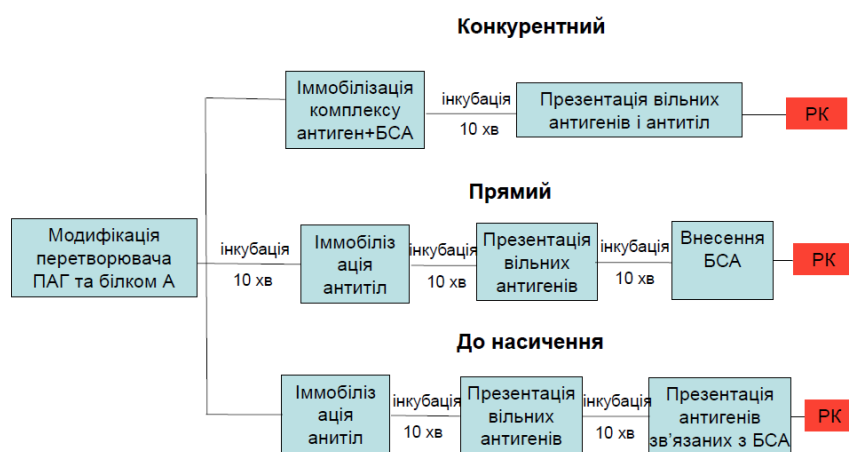


Рис. 1. Алгоритми біосенсорного аналізу: «прямий», «конкурентний», «до насичення»

Модифікація трансдюсерної поверхні наночастинками оксиду цинку.

На поверхню пластинки з розчином ZnO вносили розчин білку А в об'ємі 5 мкл і концентрації 20 мкг/мл. Інкубували білок А отриманий з бактерії *Staphylococcus aureus* на поверхні ZnO протягом 40 хв після чого промивали 0,85% розчином NaCl. Інкубацію проводили в скляній або пластиковій чашці Петрі, на дно якої

спочатку клали фільтрувальний папір, змочений водою, на нього алюмінієву підкладку, а потім пластинку. Чашку Петрі поміщали у холодильну камеру при температурі +4°C. Вносили глутаровий альдегід в об'ємі 10 мкл на поверхню пластинки та інкубували протягом 20 хв, після чого промивали 0,85% розчином NaCL. Після модифікації пластинки розчином білка А, на поверхню пластинки наносили розчин специфічних антитіл (анти-сироватка специфічна до спермідину у концентрації 100 мкг/мл і об'ємі 10 мкл, отриманих шляхом імунізації кролів спермідином кон'югованим з розчином бичачого сироваткового альбуміну) і проводили інкубацію протягом 40 хвилин та промивали 0,85% розчином NaCL. Наносили на поверхню пластинки розчин БСА в об'ємі 5 мкл і концентрації 10 мкг/мл та інкубували протягом 20 хв та промивали 0,85% розчином NaCL.

Культивування та підготовка клітин. Культуру клітин культивували з використанням середовища DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, США). Повне живильне середовище мало у своєму складі 10% фетальної телячої сироватки, 1% L-глутаміну, 1% пеніциліну та стрептоміцину. Культивували в інкубаторі з 5% вмістом CO₂. Спочатку отриману культуру клітин збирали з культурального матраца (25 см²). Середовище зливали та додавали до матрацу 2-3 мл 1% розчину трипсин-EDTA та ставили у інкубатор на 5 хв. Потім, якщо клітини відкріпилися від поверхні матрацу, їх зливали в окрему пробірку та ресуспендували, після чого центрифугували 5 хв при швидкості 430 g. Після цього робили повторне ресуспендування з додаванням фосфатно-сольового буферу та центрифугували 5 хв. при швидкості 430 g. Далі ресуспендували та відбирали клітини в об'ємі 10 мкл та додавали до 10 мкл 1% розчин трипанового синього та вносили в камеру Горяєва, для підрахунку клітин та оцінки їх життєздатності. Після чого вносили відповідну кількість клітин в культуральний матрац та додавали культуральне середовище DMEM. Після чого ставили культуральні матраци до CO₂ інкубатора.

Ліофілізація клітин. Для підготовки до проведення аналізу вмісту поліамінів у клітинах лінії раку грудної залози людини MCF-7 використовували методику ліофілізації клітин. Ліофілізація клітин використовувалася для руйнування мембрани клітин і вивільнення поліамінів. Для ліофілізації використовували клітини лінії раку грудної залози MCF-7 у кількості від 100 до 100 000 кл/мл. У пробірки об'ємом до 5 мл вносили 0,5 мл клітинної суспензії. Далі додавали 0,5 мл захисного середовища, яке складалося з 0,02 М розчину PBS, 0,85% розчину NaCl та 5% розчину сахарози. Далі вносили пробірки з суспензією і захисним середовищем у ліофілізатор і починали процес при -60 °C протягом 18 годин. Проводили вакуумне зневодження при -40 °C протягом 2 годин. Потім досушували при +4-6 °C протягом 1 години.

Визначення поліамінів у зразках сироватки крові. Наприкінці проводили кількісне та якісне визначення рівня поліамінів у сироватці крові 21 хворого на рак грудної залози. Для обробки результатів використовували статистичну програму Microsoft Excel. Для кожної групи даних робили обрахунки середнього

арифметичного із стандартною середньою похибкою. Кожен зразок вимірювали у 4-х повторях. Результат експерименту визначали як середнє значення, отримане для усіх чотирьох повторів. Для визначення статистичної достовірності показників використовували критерій Стюдента. Різницю вважали достовірною на рівні значущості 95 % ($p \leq 0,05$).

РОЗДІЛ 3: РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Визначення алгоритму аналізу. Чутливість біосенсора визначали за допомогою розчинів поліамінів у концентрації від 5 до 1000 нг/мл. Використовуючи різні алгоритми аналізу для оптимізації процедури аналізу визначили, що діапазон чутливості для біосенсора становить від 5 нг/мл до 1000 нг/мл, а мінімальна концентрація, за якої ми бачимо чіткий відгук біосенсора, становить близько 10 нг/мл. Даний діапазон чутливості було обрано, оскільки менші або більші концентрації поліамінів не виявлялися біосенсором, тому даний діапазон концентрацій поліамінів виявився оптимальним. Найбільший зсув резонансного кута ми могли спостерігати при прямому та конкурентному алгоритмі аналізу, тому що зсув резонансного кута за концентрації в 10 нг/мл, за якої ми можемо виявити чіткий сигнал становить 0,015 градусів у сперміну, 0,012 градусів у спермідину та 0,010 градусів у путресцину. При концентрації у 100 нг/мл спостерігається збільшення зсуву резонансного кута при конкурентному алгоритмі аналізу, і хоча він є меншим, ніж при прямому алгоритмі аналізу (0,090 у прямого проти 0,080 у конкурентного. Дана тенденція спостерігається майже у всіх випадках), порівняно з алгоритмом до насичення, зсув кута якого становив 0,050 градусів, конкурентний алгоритм виявився кращим. При концентрації поліамінів у 1000 нг/мл тенденція до першості прямого алгоритму аналізу зберігається. При прямому алгоритмі аналізу концентрації поліамінів, у сперміну зсув кута біосенсора становив 0,55 у сперміну, 0,19 у спермідину, та 0,13 у путресцину. Також, згідно з отриманими даними, можна спостерігати, що відхилення резонансного кута при аналізі сперміну є найбільшим у порівнянні з іншими поліамінами, що може бути пов'язане з високою спорідненістю антитіл до цих поліамінів (рис. 2).

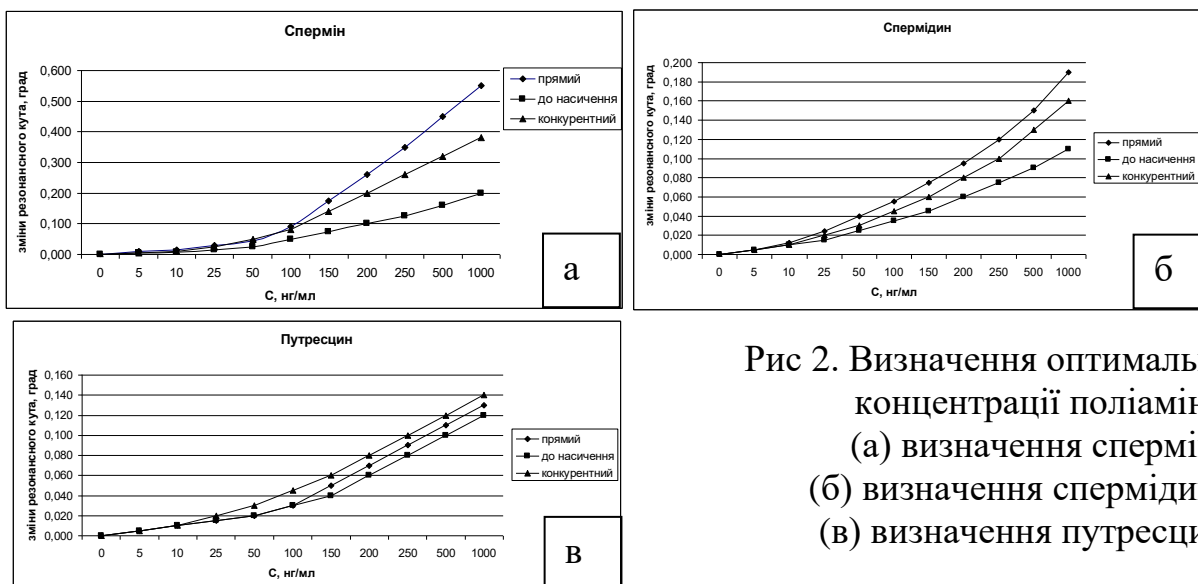


Рис 2. Визначення оптимальної концентрації поліамінів:
(а) визначення сперміну;
(б) визначення спермідину;
(в) визначення путресцину

Оптимальні концентрації знаходилися у діапазоні від 100 до 1000 нг/мл. Більший зсув резонансного кута при аналізі сперміну виник через вищу афінність антитіл саме до сперміну, порівняно зі спермідином та путрестиним, хоча структурно поліаміни подібні між собою і відрізняються різною кількістю метильних та аміногруп. Також спермін, сермідин і путресцин відрізняються за молярною масою, яка складає 202 г/моль у сперміну, 145 г/моль у спермідину і 88 г/моль у пктресцину.

Розроблена біосенсорна тест-система може детектувати як наявність поліамінів, так і їх кількість у розчині.

Визначення концентрації поліамінів в модельних розчинах. На даному етапі досліджень визначали ефективність визначення поліамінів використовуючи прямий алгоритм аналізу з оптимальним концентраціям в діапазоні від 100 до 1000 нг/мл. При проведенні аналізу сенсограма біосенсора відображала відхилення резонансного кута протягом аналізу. Відхилення резонансного кута збільшувалося з введенням кожної нової концентрації поліамінів (рис. 3). При аналізі поліамінів сперміну та спермідину біосенсор показав значне відхилення резонансного кута від значень, характерних для речовин, які реєструвались при підготовці чутливої поверхні трансдюсера; отже наявність поліамінів на поверхні трансдюсера є результатом утворення комплексу між поліамінами і спорідненими до них антитілами. Встановили, що концентрація поліамінів, за якої біосенсор був здатний їх детектувати, становить 100 нг/мл.

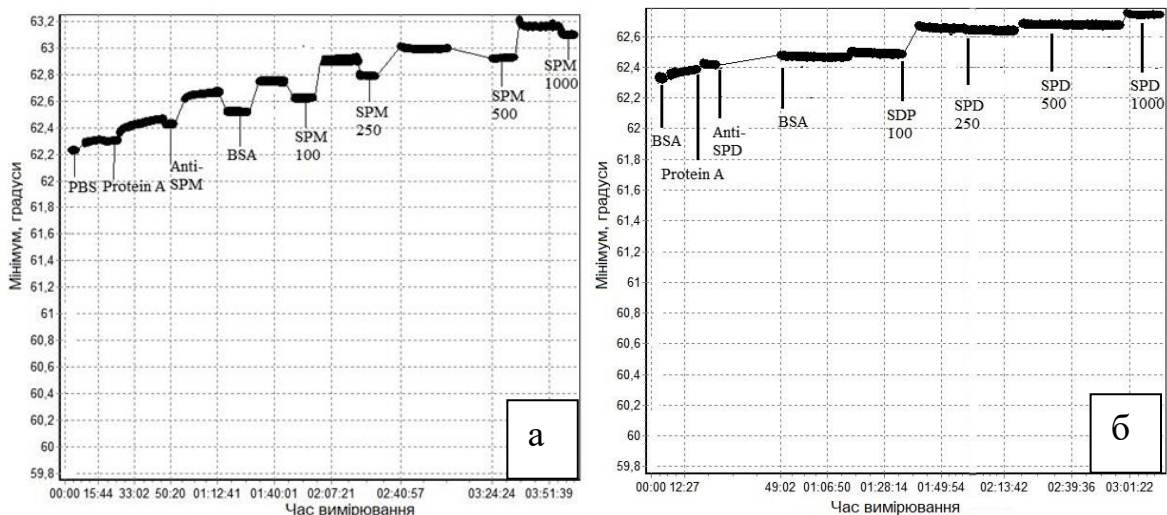


Рис. 3 Сенсограма зміни резонансного кута при визначенні оптимальної концентрації поліамінів: (а) сперміну та (б) спермідину

Було показано, що спермін є більш афінним до антитіл, оскільки відхилення резонансного кута при концентрації в усіх концентраціях значно вищі ніж у спермідину (рис. 4). Визначили, що саме використання сперміну дозволить підвищити ефективність біосенсорного аналізу у подальших експериментах.

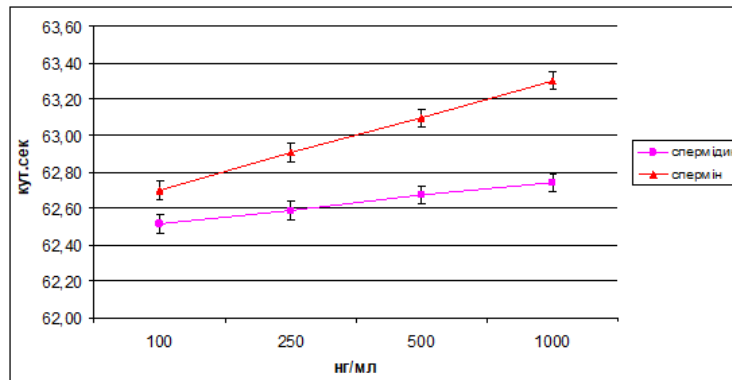


Рис. 4. Зміни резонансного кута при визначенні оптимальної концентрації спермідину та сперміну за допомогою оптичного біосенсора на основі явища ППР в модельних розчинах.

Визначення меж чутливості біосенсора на основі ППР з використанням поліамінів сперміну та побудова калібрувальної кривої. Через кращу реактивність сперміну та задля уникнення перехресної реакції з іншими поліамінами у разі антитіл було вирішено надалі використовувати лише антисироватку проти сперміну, а також лише спермін у якості аналіту у модельних розчинах. Дані проведених досліджень на модельних розчинах сперміну у подальшому використовуватимуться для побудови калібрувальної кривої для аналізу зразків сироватки крові хворих на рак грудної залози.

Для визначення концентрацій поліамінів сперміну попередньо було визначено діапазон чутливості біосенсора на основі ППР. Для проведення аналізу чутлива поверхня біосенсора була попередньо модифікована розчином білка А, та заблоковані неспецифічні сайти зв'язування за допомогою БСА. Межі цієї калібрувальної кривої залежали від концентрації сперміну. Нижчий рівень чутливості становив 5–6 нг/мл. Верхня межа чутливості біосенсора становила 1000 нг/мл. За отриманими даними при кожному підвищенні концентрації сперміну зміна резонансного кута змінювалася в діапазоні 62,8–65,6 градусів. Оптимальні концентрації знаходилися в межах 63,1–64,1 градусів при 100 нг/мл. Резонансний кут змінювався в середньому на 0,2–0,4 градуси. Отримані дані реєстрували та аналізували. Подальше підвищення концентрації сперміну біосенсор не виявляв.

Калібрувальна крива була отримана задля визначення вмісту поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози. Дані показують постійне підвищення рівня поліамінів під час додавання нової концентрації. Сенсорні здібності біосенсора не блокуються великими молекулами, оскільки вони орієнтовані на виявлення низькомолекулярних речовин (рис. 5).

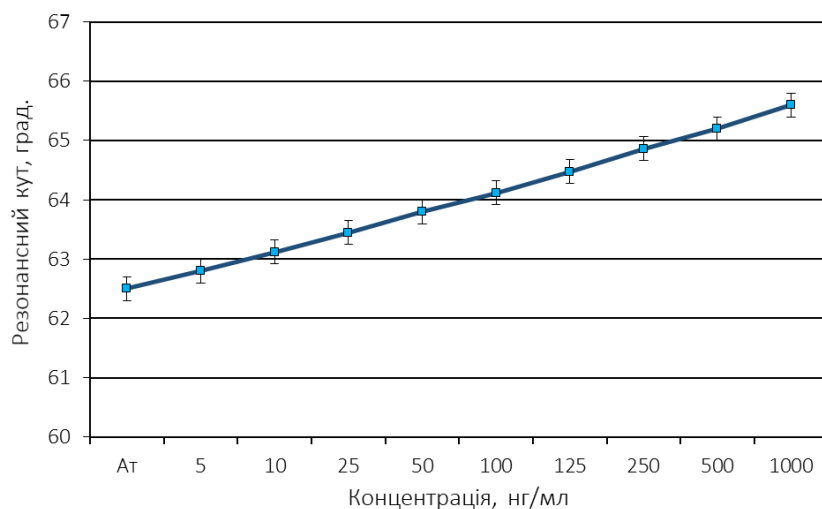


Рис. 5. Визначення зміни резонансного кута залежно від концентрації сперміну.

Культивування клітин культури MCF-7 для проведення біосенсорного експрес-тесту. Клітинну лінію раку грудної залози MCF-7 людини було обрано в якості моделі для визначення поліамінів в умовах *in vitro*. Результати культивування перевіряли кожен другий та четвертий день та оцінювали морфологію під інвертованим мікроскопом (фірма Leica, Німеччина), (рис. 6).

В результаті культивування утворювались колонії клітин у кількості в середньому 2×10^5 клітин на один культуральний матрац. Отримані клітини використовувались для подальших досліджень.

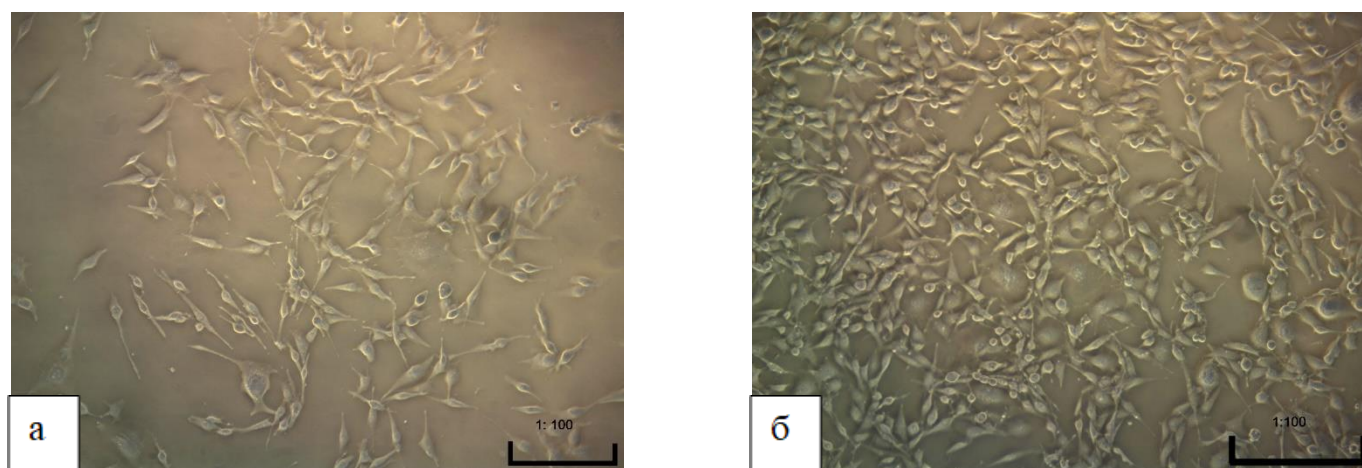


Рис. 6. Культура клітин MCF-7: а) на 2 день культивування; б) на 4 день культивування. Збільшення: x200

Визначення поліамінів за допомогою біосенсора на основі явища фотолюмінесценції наночастинок оксиду цинку (ZnO). Методика визначення поліамінів за допомогою біосенсора на основі наночастинок оксиду цинку заснована на принципі фотолюмінесценції оксидів металів після обробки лазерним променем визначеної довжини (380 нм). Після адсорбції дослідних зразків на поверхні трансдюсера інтенсивність фотолюмінесценції може

змінюватися (зростати або спадати) в залежності від молекулярної маси адсорбованих речовин та їх оптичних властивостей. Для дослідження використовували ліофілізат клітин раку грудної залози лінії MCF-7. Інтенсивність люмінесценції в модельних розчинах варіює від 6700 одиниць люмінесценції (Ол) при 10 нг/мл до 5800 Ол при 100 нг/мл. Зниження інтенсивності люмінесценції свідчить про збільшення концентрації зразка адсорбованого на поверхні трансдюсера. Дослідження наявності поліамінів у культурі клітин також показало поступове зниження фотолюмінесценції при збільшенні кількості клітин у зразку. Інтенсивність люмінесценції змінювалася від 7500 Ол у 100 кл/мл до 5900 у 100 000 кл/мл. Спираючись на дані отримані при дослідженні модельних розчинів було визначено, що концентрації поліамінів у досліджених клітинах раку грудної залози можуть знаходитись у діапазоні від 10-100 нг/мл.

За результатами проведених досліджень, біосенсор розроблений на основі даної методики дозволяє визначати поліаміни у модельних розчинах в діапазоні 10 -100 нг/мл і клітинах раку грудної залози лінії MCF-7 у кількості 100-100 000 кл/мл (рис. 7, рис. 8).

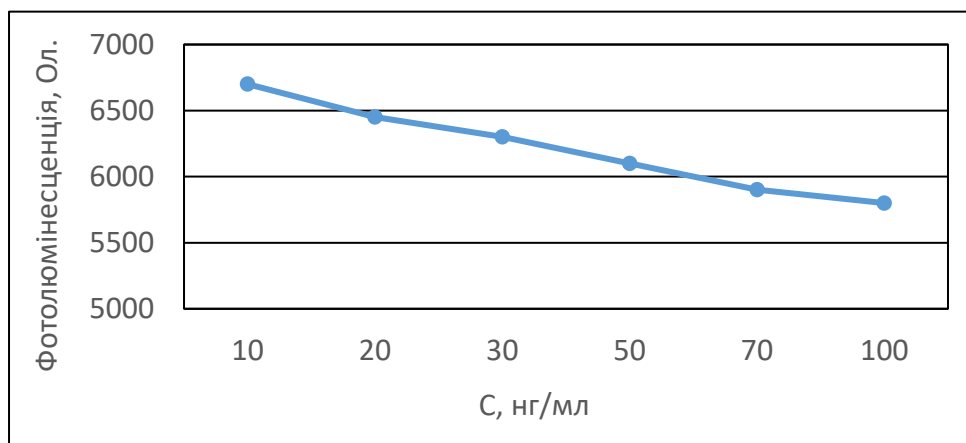


Рис.7. Зміни фотолюмінесценції в залежності від концентрації сперміну в модельних розчинах

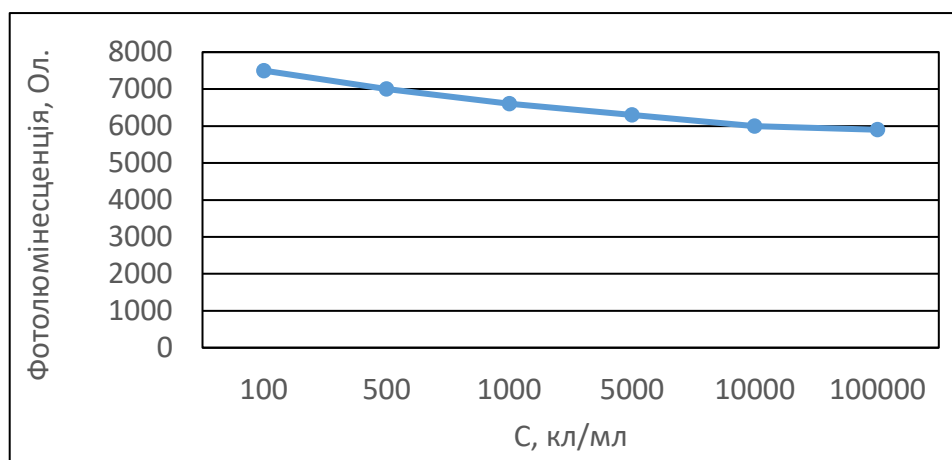


Рис 8. Зміни фотолюмінесценції в залежності від концентрації клітин лінії MCF-7

Порівняння ефективності біосенсорів на основі ZnO та Au. Для визначення ефективного біосенсора, було порівняно біосенсор з трансдюсером на основі золота та біосенсор на основі наночастинок оксиду цинку (рис. 9).

Дослідили, що малі концентрації сперміну краще визначаються біосенсором, де у якості перетворювача сигналу використовується пластинка із золотим напиленням, інтенсивність сигналу якої виявилася вищою від пластинки з наночастинками ZnO у 2 рази. При концентрації від 500 до 1000 нг/мл можна спостерігати чіткіший відгук у біосенсора з пластинкою, обробленою наночастинками ZnO, який був кращий від пластинки із золотим напиленням у 1,5 рази (рис. 10).

При аналізі ефективності визначення поліамінів у суспензії клітин MCF-7 дослідили, що у випадку з попереднім дослідом біосенсор на основі золотої пластинки визначає наявність поліамінів краще в діапазоні від 100 до 500 кл/мл і знаходиться в діапазоні від $64,3800 \pm 0,0050$ до $64,8200 \pm 0,0057$, що більше у порівнянні з відгуком біосенсора на пластинці з наночастинками ZnO в 1,5–2 рази.

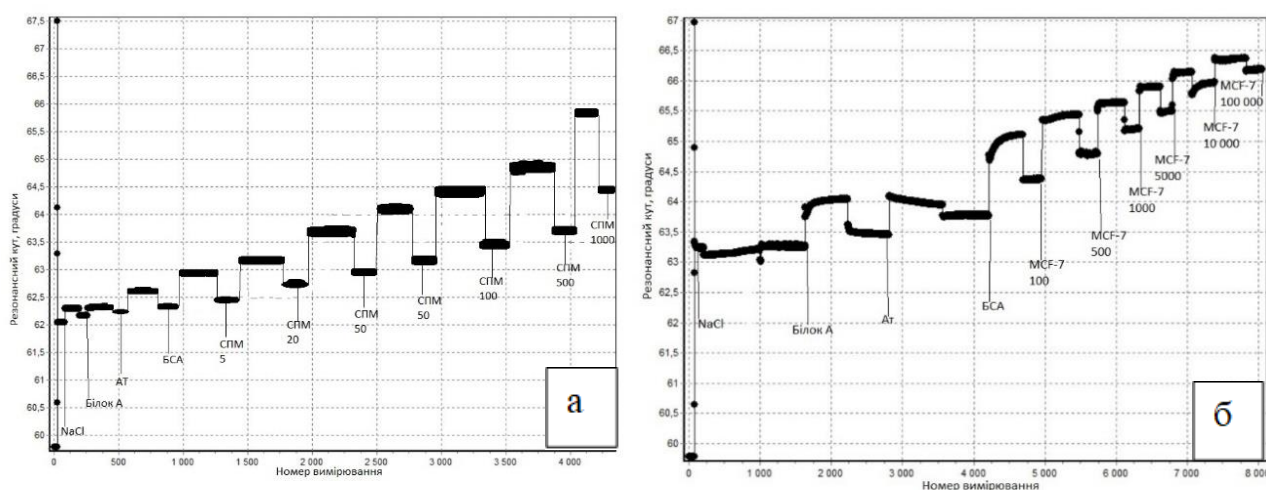


Рис. 9. Сенсорограма зсуву резонансного кута в залежності від концентрації: а) сперміну; б) клітин MCF-7

Надалі, при зростанні кількості клітин спостерігали підвищення чіткості відгуку на пластинці з наночастинками ZnO в діапазоні концентрацій від 1000 до 100 000 кл/мл у 1,5 рази у порівнянні з біосенсором на пластинці покритій шаром золота. Зсув резонансного кута знаходиться в межах від $67,2000 \pm 0,0069$ до $75,1400 \pm 0,0078$. Проаналізувавши отримані результати можна сказати, що обидва біосенсиори показали достатню ефективність і здатні визначати наявність та концентрацію поліамінів як у розчині, так і в суспензії клітин раку грудної залози MCF-7, однак, оскільки в лабораторній діагностиці першочерговим є виявлення патологічних процесів на ранніх етапах, і, як результат вчасно протидіяти захворюванню, тому надалі перспективнішим виглядає застосування біосенсора з трансдюсером, вкритим частинками золота, оскільки саме він здатен виявляти спермін краще в концентраціях від 5 до 100 нг/мл і в концентрації клітин MCF-7 від 100 до 500 кл/мл.

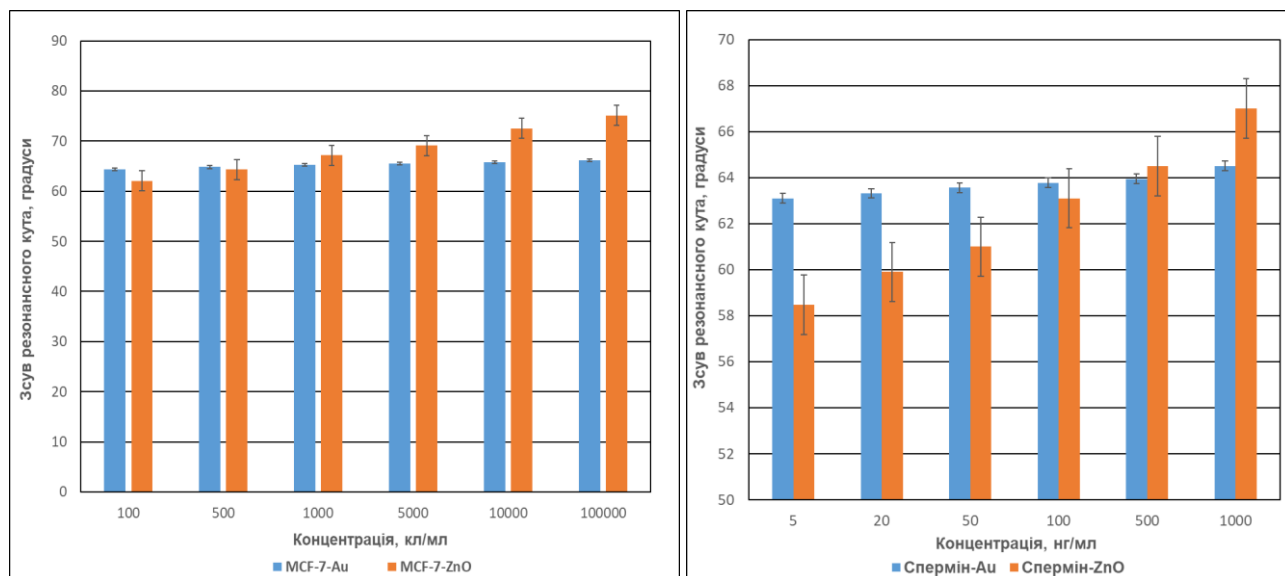


Рис. 10. Порівняння ефективності визначення поліамінів біосенсорами на основі золота та наночастинок ZnO ($\bar{x} \pm SD$, $p < 0,05$, $n=6$)

Визначення концентрації поліамінів у зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози. Для визначення рівня поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози було використано попередньо створену калібрувальну криву. В результаті проведених досліджень було проаналізовано 30 зразків сироватки крові. З них 9 було використано в якості контролю, оскільки вони були взяті у здорових людей. Проведено аналіз контрольних зразків. Встановлено, що зсув резонансного кута в цих сироватках не перевищував меж у 62,9–63,2 градуси. Дані значення корелюють з концентрацією сперміну від 5 до 10 нг/мл, які знаходяться у межах фізіологічних норм. В результаті проведених досліджень було визначено що концентрація поліамінів у зразках сироватки крові пацієнтів хворих на рак грудної залози знаходилася в межах від 20 до 100 нг/мл, що перевищує фізіологічні норми. Концентрація поліамінів у контрольній групі не перевищувала 7 нг/мл, тоді як концентрація поліамінів у II групі становила 21–27,2 нг/мл. У III групі концентрація поліамінів була в діапазоні 52,5–55,3 нг/мл (рис. 11).

Розроблена методика імунобіосенсорного аналізу на основі явища ППР дозволяє виявляти поліаміни в сироватці крові здорових і хворих людей в концентрації 5-125 нг/мл.

Широкий діапазон чутливості, малий об'єм часу та висока точність розробленої методики робить її актуальною та перспективною для подальшого вдосконалення та використання.

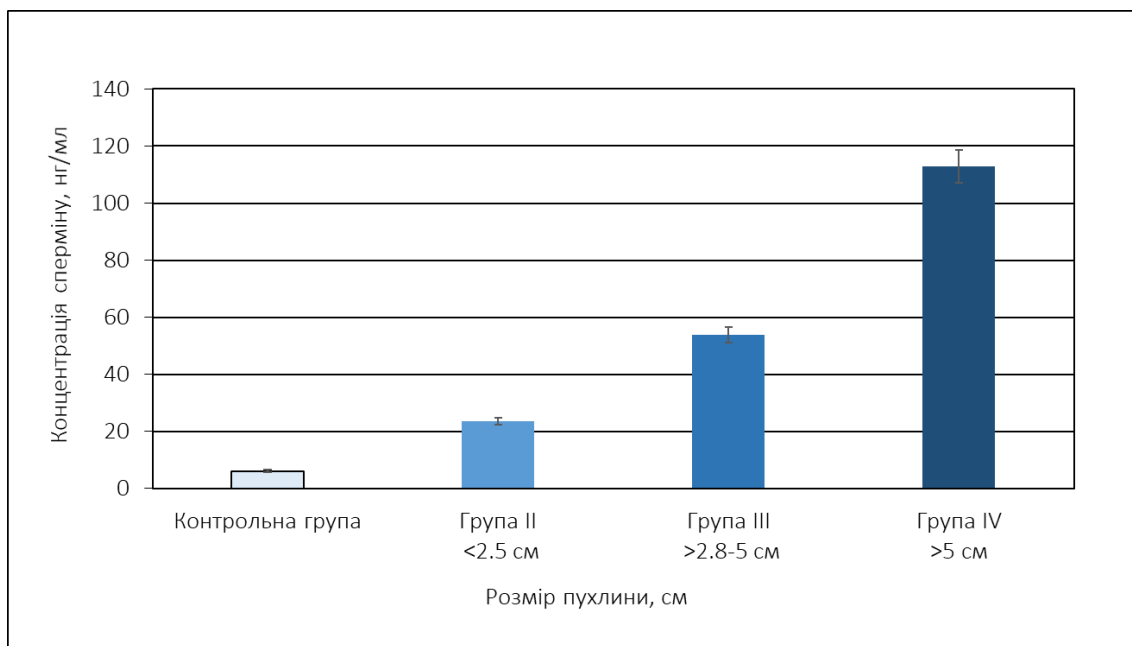


Рис. 11. Концентрація поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози залежно від розміру пухлини у 4 групах: контрольна група – здорові; II група – пацієнти віком від 45 до 55 років, 2 стадія захворювання, розмір пухлини менше 2,5 см; III група – пацієнти віком від 55 до 65 років, 3 стадія захворювання, розмір пухлини більше 2,8 см; IV група – пацієнти віком від 65 до 70 років, 4 стадія захворювання, розмір пухлини більше 5 см; ($p < 0,05$).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної задачі щодо визначення біогенних поліамінів у модельних розчинах, культурі клітин раку грудної залози лінії MCF-7 та зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози. Згідно з отриманими результатами було зроблено наступні висновки.

1. За результатами порівняння ефективності визначення поліамінів за допомогою різних алгоритмів імунобіосенсорного аналізу найкращі показники було отримано за допомогою прямого алгоритму аналізу. Визначення поліамінів прямим алгоритмом виявилось ефективнішим за конкурентний та «до насичення» на 17% і 35% відповідно.

2. Встановлено межі чутливості визначення поліамінів за допомогою оптичного біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу в діапазоні 5-1000 нг.

4. Досліджено, що біосенсор на основі явища фотолюмінесценції оксиду цинку здатен визначати поліаміни в культурі клітин раку грудної залози у концентрації від 10 до 100 нг/мл.

5. Серед використаних біосенсорів найбільш ефективним виявився біосенсор на основі ефекту ППР, який виявився ефективнішим на 14-30% у порівнянні з біосенсором на основі наночастинок ZnO.

6. Результати перевірки ефективності розробленого біосенсора для визначення зразків хворих на рак грудної залози дозволили встановити високу

специфічність імуноаналізу методом поверхневого плазмонного резонансу. Чутливість розробленої методики дозволила визначити концентрації поліамінів у хворих різних за віком та стадією захворювання.

7. Результати індикації поліамінів за допомогою розробленої методики біосенсорного аналізу на основі явища поверхневого плазмонного резонансу підтверджують коректність використання експрес-методу і доцільність його запровадження у практичних умовах.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. **Прилуцький М. П.**, Стародуб М.Ф. «Якісний та кількісний аналіз поліамінів сперміну та спермідину, як маркерів раку грудної залози з використанням біосенсора на основі ППР»/ М. П. Прилуцький, М.Ф. Стародуб М.Ф. // Наукові записки НАУКМА. -2017. - с.-62-68.

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних

2. **Prylutskyi M. P.**, Starodub M. F. Polyamine analysis in solution and culture in vitro using the immunobiosensor on the basis of ZnO nanoparticles for early diagnostics of oncological diseases/ M. F. Starodub, M. P. Prylutskyi // Experimental oncology. – 2019. – Т. 41. - № 4. - Р. 1-3.
3. **Prylutskyi M. P.** et al. Express control of levels of polyamines by immune biosensor based on SPR / M. P. Prylutskyi, N. F. Starodub, T. S. Lebyedyeva, P. B. Shpylovyy//Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation. – 2018. – V. 25. – № 2. – Р. 59-63.
4. **Prylutskyi, M. P.**, Bilko, N. M., Starodub, N. F. Detection of biogenic polyamines in blood of patients with breast cancer / M. P. Prylutskyi, N. M. Bilko, N. F. Starodub// Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2019. – V. 10. - № 2 – Р. 257-263.
5. **Прилуцький М. П.**, Стародуб М. Ф., Феделеш-Гладинець М. І. Порівняння ефективності імунобіосенсорів на основі золота та ноночастинок ZnO за аналізу рівнів сперміну в культурі клітин *in vitro*/ **М. П. Прилуцький**, М. Ф. Стародуб, М. І. Феделеш-Гладинець// Біологічні системи теорія та інновації. – 2019. – Т. 10. - № 4. – с. 22-30

Статті у фахових іноземних виданнях

6. **Prylutskyi M.**, Starodub N., Bilko N. “Determination of the Concentration of Polyamines with SPR-based Immune Biosensor for Early Diagnostics of Breast Cancer” / **M. Prylutskyi**, N. Starodub, N. Bilko //Biosensors&Bioelectronics.- 2016.- V.7.- № 4.- P.1-10

Патенти

7. **Прилуцький М. П.**, Стародуб М. Ф, Білько Д. І. Патент на корисну модель 118303, МПК: G01N 33/483 G01N 33/547, G01N 33/574 G01N 21/66. Спосіб визначення поліамінів для експресної діагностики раку грудної залози в умовах *in vitro*. Заявник і патентовласник Національний університет «Києво-Могилянська академія». № у 2017 03303; заявлено 06.04.2017; опубліковано 25.07.2017; Бюл. № 14

Тези наукових доповідей

8. **Prilutskiy M. P.** Efficiency of the SPR-based immune biosensor at the express determination of polyamines. III міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» 22-23 жовтня 2015 року. м. Київ
9. **Prilutskiy M.**, Starodub N. F., T. S., Lebededeva, P. Shplylovyy "Non-labeled immune biosensor for express control of spermine and spermidine levels", «Біотехнологія: звершення та надії 22-24 травня 2015 року. м. Київ
10. **Прилуцький М. П.**, Стародуб М. Ф. Оптичний імунобіосенсорний підхід для експресного визначення рівня поліамінів при ранній діагностиці раку грудної залози. 7-а Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» 30 травня – 3 червня 2016 року. м. Одеса.
11. **Прилуцький М. П.**, Стародуб М.Ф. «Імунобіосенсорний аналіз онкобіохімічних маркерів сперміну та спермідину в системі *in vitro*». Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Профілактика неінфекційних захворювань: фокус на коморбідність». 3 листопада 2017 року, м. Харків.
12. **Prylutskyi M. P.**, Starodub N. F. Analysis of polyamine levels in blood serum of patients with breast cancer using optical SPR-based immune biosensor. "International scientific conference on medicine", 22 лютого 2019 року. м. Рига, Латвія.

АНОТАЦІЯ

Прилуцький М. П. Розробка біосенсорних платформ та базових алгоритмів аналізу для експресної діагностики раку грудної залози в умовах *in vitro*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 «біотехнологія». Національний технічний університет України "Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського", 2020р.

В дисертації описано розробку методики визначення поліамінів в культурі клітин лінії MCF-7 та в сироватці крові хворих на рак грудної залози і вивчення біологічних властивостей поліамінів, як потенційних маркерів раку грудної залози. Окрім того, порівняно декілька типів біосенсорних пристроїв, в яких використаний різний підхід до сенсibiliзації чутливої поверхні трансдюсера, а також порівняно декілька типів трансдюсерної поверхні для визначення найчутливішої біосенсорної платформи.

Для створення ефективної біосенсорної платформи було порівняно декілька алгоритмів аналізу з використанням біосенсора, аби визначити найчутливіший та найефективніший. Серед усіх використаних алгоритмів аналізу найвищу ефективність показав прямий алгоритм аналізу, за якого специфічні антитіла та поліаміни були іммобілізовані безпосередньо на поверхні трансдюсера без додаткової модифікації. Наступним етапом стало визначення меж чутливості біосенсора з прямим алгоритмом аналізу. Діапазон чутливості новоствореного біосенсора знаходиться в межах 5-1000 нг/мл. Ефективність

аналізу покращилася після модифікації поверхні трансдюсера додатковими речовинами, що дозволило збільшити чутливість поверхні трансдюсера, зорієнтувати антитіла специфічними до поліамінів ділянками та заблокувати неспецифічні місця зв'язування. Надалі було порівняно ефективність новоствореної методики біосенсорного аналізу з біосенсором на основі фотолюмінесценції оксиду цинку. Біосенсор на основі явища поверхневого плазмонного резонансу виявився кращим у індикації поліамінів у модельних розчинах та культурі клітин лінії раку грудної залози людини MCF-7 на 14-30% порівняно з біосенсором на основі фотолюмінесценції оксиду цинку. Окрім того, трансдюсер на основі золота здатен у 1,5-2 рази краще визначати поліаміни в культурі клітин і модельних розчинах.

На останньому етапі досліджень було встановлено, що зсув резонансного кута в контрольних сироватках крові не перевищував меж у 5 -10 нг/мл, а у зразках крові хворих на рак грудної залози концентраціях поліамінів перебувала в діапазоні від 20 до 100 нг/мл, що перевищує фізіологічні рівні. За отриманими результатами розроблений біосенсорний метод дозволяє виявити як низькі, так і високі концентрації поліамінів.

Новостворена біосенсорна платформа може виявляти поліаміни в розчині та в культурі клітин *in vitro* в наномолярних концентраціях, а також в сироватці крові, що робить її актуальною та перспективною для подальшого вдосконалення і використання.

Ключові слова: поліаміни, ППР, біосенсиори, наночастинки, трансдюсер, спермін, спермідин, путресцин.

АННОТАЦИЯ

Прилуцкий М. П. Разработка биосенсорных платформ и базовых алгоритмов анализа для экспрессной диагностики рака грудной железы в условиях *in vitro*. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 «биотехнология». Национальный технический университет Украины "Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского", 2020 г.

В диссертации разработана методика определения полиаминов в культуре клеток линии MCF-7 и в сыворотке крови больных раком молочной железы и изучения биологических свойств полиаминов, как потенциальных маркеров рака грудной железы. Для сравнения эффективности использовали несколько типов биосенсорных устройств, в которых применён разный подход к sensibilization чувствительной поверхности трансдюсера. Также было использовано несколько типов трансдюсеров с разным покрытием поверхности для определения эффективной платформы для определения полиаминов.

В начале исследований для создания эффективной биосенсорной платформы было решено сравнить эффективность нескольких алгоритмов анализа с использованием биосенсора, чтобы определить самый чувствительный и эффективный подход. Среди всех использованных алгоритмов анализа наивысшую эффективность показал прямой, при котором специфические антитела и полиамины иммобилизировали непосредственно на поверхности

трансдюсера. Следующим этапом стало определение границ чувствительности биосенсора с прямым алгоритмом анализа. Диапазон чувствительности биосенсора составлял 5-1000 нг/мл. Эффективность анализа улучшилась после модификации поверхности трансдюсера дополнительными веществами, что позволило увеличить чувствительность поверхности трансдюсера, сориентировать антитела специфичными к полиаминов участками и заблокировать неспецифические места связывания. Сравнили эффективность методики биосенсорного анализа на основе эффекта ППР с биосенсором на основе фотолюминесценции оксида цинка. Биосенсор на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса оказался лучшим в определении полиаминов в модельных растворах и культуре клеток рака грудной железы человека линии MCF-7 на 14-30% в сравнении с биосенсором на основе фотолюминесценции оксида цинка. Кроме того, трансдюсер на основе золота способен в 1,5-2 раза лучше определять полиамины в культуре клеток и модельных растворах.

Исследовали соответствие смещения резонансного угла биосенсора к концентрации полиаминов при анализе образцов сыворотки крови пациентов больных раком грудной железы. Концентрация полиаминов в контрольных образцах сыворотки крови не превышала 5 -10 нг/мл, а в образцах крови больных раком грудной железы, концентрация полиаминов находилась в диапазоне 20-100 нг/мл, что превышает физиологические уровни. По полученным результатам разработан биосенсорный метод, позволяющий выявить как низкие, так и высокие концентрации полиаминов.

Новая биосенсорная платформа может определять наличие и концентрацию полиаминов в растворе и в культуре клеток *in vitro* в наномолярных концентрациях, а также в сыворотке крови, что делает ее актуальной и перспективной для дальнейшего совершенствования и использования.

Ключевые слова: полиамины, ППР, биосенсоры, наночастицы, трансдюсер, спермин, спермидин, путресцин.

SUMMARY

Prylutskyi M. P. Development of biosensor platforms and basic analysis algorithms for express diagnostics of breast cancer *in vitro*. – the Manuscript

Thesis for a Candidate Degree in Biology in the speciality 03.00.20 "Biotechnology". National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", 2020.

The Thesis describes the development of a method for the determination of polyamines in the culture of MCF-7 cells and in the blood serum of patients with breast cancer and study of the biological properties of polyamines as potential markers of breast cancer. To compare the efficiency of newly created biosensor platform, several types of biosensor devices were used, in which a different approach for sensitizing the surface of the transducer was applied. Several types of transducers with different surface coatings have also been used to determine an effective platform for polyamine determination.

At the beginning of research to create an effective biosensor platform, it was decided to compare the effectiveness of several algorithms of to determine the most sensitive and effective approach. Among all the used analysis algorithms, the highest efficiency was shown by the "direct" approach, in which specific antibodies and polyamines were immobilized directly on the surface of the transducer. The next step was to determine the limits of the biosensor sensitivity with a direct analysis algorithm. The biosensor sensitivity range was 5-1000 ng/ml. The efficiency of the assay improved after modification of the transducer surface with additional substances, which made it possible to increase the sensitivity of the transducer surface, orient antibodies to polyamine-specific sites, and block non-specific binding sites. The efficiency of the biosensor analysis method based on the SPR effect was compared with a biosensor based on photoluminescence of zinc oxide. The biosensor based on the effect of surface plasmon resonance turned out to be the best in the determination of polyamines in model solutions and cell culture of the human breast cancer cell line MCF-7 by 14-30% in comparison with the biosensor based on photoluminescence of zinc oxide. In addition, a gold-based transducer is able to detect polyamines in cell culture and model solutions 1.5-2 times better.

The correspondence of the displacement of the resonance angle of the biosensor to the concentration of polyamines in the analysis of blood serum samples from patients with breast cancer was studied. The concentration of polyamines in the control blood serum did not exceed the limits of 5-10 ng/ml, and in the blood samples of patients with breast cancer, the concentration of polyamines was in the range of 20-100 ng/ml, which exceeds physiological levels. Based on the results obtained, a biosensor method has been developed that can detect both low and high concentrations of polyamines.

The new biosensor platform can determine the presence and concentration of polyamines in solution and *in cell culture in vitro* at nanomolar concentrations, as well as in blood serum, which makes it relevant and promising for further improvement and use.

Keywords: polyamines, SPR, biosensors, nanoparticles, transducer, spermine, spermidine, putrescine.